

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003-524590

(P2003-524590A)

(43)公表日 平成15年8月19日(2003.8.19)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークコード(参考)
A 61 K 38/22		A 61 K 31/355	4 C 0 8 4
	31/355	31/375	4 C 0 8 5
	31/375	35/14	Z 4 C 0 8 6
	35/14	39/395	Y 4 C 0 8 7
	38/00	45/00	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-555609(P2000-555609)
(86) (22)出願日	平成11年6月21日(1999.6.21)
(85)翻訳文提出日	平成12年1月31日(2000.1.31)
(86)国際出願番号	PCT/US99/13958
(87)国際公開番号	WO99/066923
(87)国際公開日	平成11年12月29日(1999.12.29)
(31)優先権主張番号	60/090,167
(32)優先日	平成10年6月22日(1998.6.22)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/097,897
(32)優先日	平成10年8月26日(1998.8.26)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	サイトメディックス・インコーポレーテッド Cytomedix Inc. アメリカ合衆国アリゾナ州72211, リトル・ロック, サウス・ボーマン・ロード 1527, スイート ジー
(72)発明者	ワーデン, チャールズ・イー アメリカ合衆国アリゾナ州72211, リトル・ロック, サウス・ボーマン・ロード 1527, スイート ジー
(74)代理人	弁理士 村本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改良された濃縮血小板創傷治癒剤に対する特許の適用

(57)【要約】

療法に有効な量の活性化増殖因子およびアスコルビン酸  
および/または少なくとも1種類のレチノイドおよび/  
または少なくとも1種類の抗生物質を含む、新組織の增  
殖を促進する創傷治癒剤組成物。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 療法に有効な量の活性化増殖因子およびアスコルビン酸を含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項2】 増殖因子が血小板に由来する、請求項1記載の創傷治癒剤。

【請求項3】 増殖因子が血小板由来増殖因子（P D G F）、血小板由来血管形成因子（P D A F）、血管内皮増殖因子（V E G F）、血小板由来上皮増殖因子（P D E G F）、血小板第4因子（P F - 4）、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ （T G F - B）、酸性線維芽細胞増殖因子（F G F - A）、塩基性線維芽細胞増殖因子（F G F - B）、トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$ （T G F - A）、インスリン様第1および第2増殖因子（I G F - 1 および I G F - 2）、 $\beta$ -トロンボグロブリン関連タンパク質（B T G）、トロンボスponジン（T S P）、フィプロネクチン、フォンバレンプラント因子（v W F）、フィプロペプチドA、フィブリノーゲン、アルブミン、プラスミノーゲンアクチベーター第1阻害物質（P A I - 1）、オステオネクチン、R A N T E S、g r o -  $\alpha$ 、ビトロネクチン、フィブリンド二量体、V因子、アンチトロンビンI I I、免疫グロブリン-G（I g G）、免疫グロブリン-M（I g M）、免疫グロブリン-A（I g A）、a 2マクログロブリン、アンギオゲニン、F g - D、エラスターーゼ、角質細胞増殖因子（K G F）、上皮増殖因子（E G F）、線維芽細胞増殖因子（F G F）、腫瘍壞死因子（T N F）、線維芽細胞増殖因子（F G F）およびインターロイキン-1（I L - 1）、ならびにその組合せよりなる群から選択される、請求項1記載の創傷治癒剤。

【請求項4】 活性化が、トロンビン、コラーゲン、セロトニン、アデノシン二リン酸（A D P）およびアセチルコリン（A C H）、ならびにその組合せよりなる群から選択されるアゴニストの含有により起きる、請求項1記載の創傷治癒剤。

【請求項5】 増殖因子が濃縮血小板に含有され、活性化がトロンビンにより起きる、請求項1記載の創傷治癒剤。

【請求項6】 濃縮血小板が創傷患者自身の生物学的材料から得られ、白血球数が約 $3 \times 10^7$ 細胞/m l未満である、請求項5記載の創傷治癒剤。

【請求項7】 療法に有効な量の、濃縮血小板、アスコルビン酸およびトロンビンを含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項8】 療法に有効な量の、濃縮血小板、少なくとも1種類のレチノイド、およびトロンビンを含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項9】 レチノイドがビタミンAである、請求項8記載の創傷治癒剤組成物。

【請求項10】 レチノイドがビタミンEである、請求項8記載の創傷治癒剤組成物。

【請求項11】 療法に有効な量の、濃縮血小板、少なくとも1種類の抗生物質、およびトロンビンを含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項12】 抗生物質が少なくともシュードモナス(*Pseudomonas*)およびクレブシェラ(*Klebsiella*)細菌に対し殺菌性である、請求項11記載の創傷治癒剤。

【請求項13】 抗生物質がネオスポリン、バンコマイシンおよびゲンタマイシン、ならびにその組合せよりなる群から選択される、請求項11記載の創傷治癒剤。

【請求項14】 濃縮血小板、アスコルビン酸、少なくとも1種類のレチノイド、少なくともシュードモナスおよびクレブシェラに対し殺菌性である少なくとも1種類の抗生物質、ならびにトロンビンを含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項15】 約8mlの濃縮血小板、約1mlのアスコルビン酸および約1mlのトロンビンを含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項16】 さらに、約1mlのビタミンAおよびビタミンEを含む、請求項15記載の創傷治癒剤組成物。

【請求項17】 療法に有効な量で、活性化増殖因子をアスコルビン酸と混合する工程を含む、創傷治癒剤組成物の製造方法。

【請求項18】 活性化増殖因子が、濃縮血小板を隔離し、これらの血小板をトロンビンと混合する工程により得られる、請求項17記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項19】 隔離が、血液を少なくとも約2,000～約3,000rp

mの範囲のいずれかの速度で約15～約25分間遠心することにより血小板を他の血液成分から分離し、次いで少なくとも約4,000～約5,600 rpmの範囲のいずれかの速度で約5～約10分間遠心することによりこれらの血小板をさらに濃縮し、そして濃縮血小板とアスコルビン酸、次いでトロンビンを、目的レベルの粘度および持続性をもつゲルを形成しあつ療法に有効な量の治癒剤を得るのに十分な量で混合する工程を含む、請求項18記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項20】 血小板をまず分離するための遠心速度が約2,400 rpm、遠心期間が約20分であり；

血小板をさらに濃縮するための遠心速度が約4,800 rpm、遠心期間が約7 1/2分であり；そして

約1mlのアスコルビン酸を約8mlの濃縮血小板に混入する、

請求項19記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項21】 トロンビン量が、塩化カルシウム水溶液約1.0ml中約5,000単位である、請求項20記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項22】 トロンビンを混合する前に、創傷治癒をさらに高めるのに足る量の少なくとも1種類のレチノイドを混合することをさらに含む、請求項17記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項23】 レチノイドが、刺激に対する創傷患者の免疫系の非応答性を低下させるのに足る量のビタミンA、および創傷治癒をさらに高めるのに足る量のビタミンEである、請求項22記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項24】 約1mlのビタミンAおよびビタミンEを、約8mlの濃縮血小板および約1mlのアスコルビン酸と混合し、次いで塩化カルシウム水溶液約1.0ml中約5,000単位のトロンビンと混合する、請求項23記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項25】 トロンビンを混合する前に、細菌感染を低下させるのに足る量の少なくとも1種類の抗生物質を混合することをさらに含む、請求項17記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項26】 抗生物質が少なくともショードモナスおよびクレブシェラ細

菌に対し殺菌性である、請求項25記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項27】 抗生物質がネオスポリン、バンコマイシンおよびゲンタマイシン、ならびにその組合せよりなる群から選択される、請求項25記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項28】 トロンビンを混合する前に、療法に有効な量で、濃縮血小板、アスコルビン酸、少なくとも1種類のレチノイド、ならびに少なくともショードモナスおよびクレブシエラ細菌に対し殺菌性である少なくとも1種類の抗生物質を混合する工程を含む、創傷治癒剤の製造方法。

【請求項29】 患者から血液を採取し；本質的に分離した血漿バンド、本質的に分離した赤血球バンド、およびそれらの間にある濃縮血小板を含む本質的に中間のグループが現れるまで、血液を遠心し；血漿バンドを分離し；残りの血液成分をその速度でそれに十分な期間遠心し；濃縮血小板を分離し；そして療法に有効な量で、この濃縮血小板をトロンビンと混合する工程を含む、創傷治癒剤組成物の製造方法。

【請求項30】 患者から約125～250mlの血液を採取し；その血液をラサムボウルに移して、血漿バンドが上端に生成し、赤血球バンドがボウルの底に生成し、それらの間に濃縮血小板を含む本質的に中間のグループが生成するまで、約4,800rpmで約10分間、血液を遠心し；残りの血液成分の2回目の遠心をその速度でその期間行う、請求項29記載の創傷治癒剤組成物の製造方法。

【請求項31】 療法に有効な量の活性化増殖因子およびアスコルビン酸を含む組成物を、創傷治癒を高めるのに十分な量で適用する工程を含む、創傷治療方法。

【請求項32】 増殖因子が血小板に由来する、請求項31記載の創傷治療方法。

【請求項33】 増殖因子が、血小板由来増殖因子（PDGF）、血小板由来脈管形成因子（PDGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）、血小板由来上皮増殖因子（PDGF）、血小板第4因子（PF-4）、トランスフォーミング増殖因子β（TGF-B）、酸性線維芽細胞増殖因子（FGF-A）、塩基性線維

芽細胞増殖因子（FGF-B）、トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$ （TGF-A）、インスリン様第1および第2増殖因子（IGF-1およびIGF-2）、 $\beta$ -トロンボグロブリン関連タンパク質（BTG）、トロンボスピニン（TSP）、フィプロネクチン、フォンバレンプラント因子（vWF）、フィプロペプチドA、フィブリノーゲン、アルブミン、プラスミノーゲンアクチベーター第1阻害物質（PAI-1）、オステオネクチン、RANTES、gr-o- $\alpha$ 、ビトロネクチン、フィブリンD二量体、V因子、アンチトロンビンIII、免疫グロブリン-G（IgG）、免疫グロブリン-M（IgM）、免疫グロブリン-A（IgA）、a2マクログロブリン、アンギオゲニン、Fg-D、エラスター、角質細胞増殖因子（KGF）、上皮増殖因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、腫瘍壞死因子（TNF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）およびインターロイキン-1（IL-1）、ならびにその組合せよりなる群から選択される、請求項31記載の創傷治療方法。

【請求項34】 活性化が、トロンビン、コラーゲン、セロトニン、ADPおよびアセチルコリン（ACh）、ならびにその組合せよりなる群から選択されるアゴニストの含有により起きる、請求項31記載の創傷治療方法。

【請求項35】 増殖因子が濃縮血小板に由来し、活性化がトロンビンの含有により起きる、請求項31記載の創傷治療方法。

【請求項36】 濃縮血小板が創傷患者自身の生物学的材料から得られる、請求項31記載の創傷治療方法。

【請求項37】 創傷治癒剤組成物が濃縮血小板、アスコルビン酸およびトロンビンを含む、請求項31記載の創傷治療方法。

【請求項38】 創傷治癒剤組成物が濃縮血小板およびトロンビンを含み、さらに少なくとも1種類のレチノイドを含む、請求項31記載の創傷治療方法。

【請求項39】 レチノイドがビタミンAである、請求項38記載の創傷治療方法。

【請求項40】 レチノイドがビタミンEである、請求項38記載の創傷治療方法。

【請求項41】 創傷治癒剤組成物が濃縮血小板およびトロンビンを含み、さ

らに少なくとも1種類の抗生物質を含む、請求項3・1記載の創傷治療方法。

【請求項4・2】 抗生物質が少なくともシュードモナスおよびクレブシエラ細菌に対し殺菌性である、請求項4・1記載の創傷治療方法。

【請求項4・3】 抗生物質がネオスポリン、パンコマイシンおよびゲンタマイシン、ならびにその組合せよりなる群から選択される、請求項4・1記載の創傷治療方法。

【請求項4・4】 創傷治癒剤組成物が濃縮血小板、アスコルビン酸、少なくとも1種類のレチノイド、シュードモナスおよびクレブシエラに対し殺菌性である少なくとも1種類の抗生物質、ならびにトロンビンを含む、請求項3・1記載の創傷治療方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本出願は係属中の国際特許出願第U S 99/02981号（1999年2月13日出願、米国特許庁を受理官庁とする）の一部継続出願であり、これは米国仮特許出願第60/090,167号（1998年6月22日出願）および米国仮特許出願第60/097,897号（1998年8月26日出願）に基づく出願日の優先権を主張する。

## 【0002】

## 発明の背景

本明細書に開示する発明は、一般に創傷の治療に用いる組成物、その製造方法、およびその使用方法に関する。

## 【0003】

これまで、創傷のタイプや場所および程度に応じて、創傷治療のための多様な物質および方法が開発された。創傷は一般に、ヒトまたは動物の身体領域に対する損傷と定義される。皮膚の表面に対する損傷は最もよく知られたタイプの創傷であるが、体内臓器の表面も、たとえば手術中、脾臓や肝臓の破裂に際し、または体内臓器付近の体表の外傷性殴打の結果、創傷を生じることがある。

## 【0004】

医療では、創傷の残留性や程度に従って創傷を慢性または急性に分ける。慢性創傷は、即座に治癒せずに持続または遅延するものである。急性創傷は比較的急激に起き、かつ比較的速やかに治癒するものである。組織の創傷は、組織（またはその表面）の異常な顕微鏡的裂傷もしくは亀裂程度にすぎない小さなものの、または身体の実質部分を覆う皮膚の剥脱もしくは剥離（たとえば火傷）という大きなものまで、広範に発現する。大きな表面または運動性表面を覆う急性創傷は、通常は感染からの保護や治癒が最も困難である。

## 【0005】

本明細書に記載する発明は主に慢性創傷の外面に局所適用する物質に関するが、本明細書に記載する発明には急性創傷など他の創傷の治癒を促進するためのある種の用途もある。本明細書に記載する組成物は、火傷および慢性病変、たとえ

ば糖尿病患者の足の潰瘍に局所適用するのに特に適している。しかし、本明細書に記載する組成物および方法は局所適用だけに限定されない。

#### 【0006】

創傷の治癒は、血液や体液中にみられるさまざまな物質の存在により影響される。血液は、治癒剤を創傷部位へ運び、かつ異物や有害物質を創傷から運び去る主な媒質である。全血は、主に3つの主なタイプの細胞がタンパク質に富む溶液（血漿として知られる）中に懸濁したものからなる。

#### 【0007】

全血の3つの主細胞タイプは、赤血球、白血球および血小板である。赤血球は、酸素を身体組織へ輸送および伝達し、かつ二酸化炭素を除去するのを助成する鉄含有細胞である。白血球は、異物の食作用および抗体の産生などの機能を行い、主に血中や創傷部位内の感染性物質や異物と戦う役目をもつ。血小板は、血管の漏れを塞ぎ、凝血塊を形成するプロセスの開始を助けるなど、多数の機能を行う；血小板は新組織の形成を促進する増殖因子として知られる物質を含有する。

#### 【0008】

全血をその種々の成分に分離する方法は幾つかあるが、最も簡便かつ迅速な方法は、血液またはその成分の一部を分画遠心することにより行われる（すなわちアフェレーシス：apheresis）。この方法では、赤血球および白血球ならびに血漿を分離してドナーまたは患者の身体に戻すことができ、本質的に濃縮された形の隔離（sequestrated）血小板が創傷治癒法に用いるために残る。患者より採取した血液からこうして血小板を得て、その同じ患者に用いるために活性化することができる；患者自身の血液を用いる方法を“自己”または“自原性”供血法と呼ぶ。患者が用いるために1以上の第三者が提供した血液を用いる方法を“同種”もしくは“異種”供血法と呼ぶか、またはまとめて“異系”と呼ぶ。

#### 【0009】

血漿中に懸濁したタンパク質の1つはフィブリノーゲンであり、これは創傷部位に放出（または吸収）された物質と反応して、粘稠なフィブリンストランドを生成する。反応の結果、ストランドが架橋して網を形成し、これは創傷部位に他

の組織材料が沈着または成長するのを保持および支持する。

#### 【0010】

創傷治癒プロセスは一般に幾つかの段階で起きると考えられ、これは一般に治癒カスケードとして知られている。組織が損傷を受けた後、創傷付近に出現する最初の細胞のひとつが血小板である。アゴニスト、たとえばトロンビンまたは本明細書の他の箇所に挙げた他のアゴニストにより血小板が活性化されると、血小板内から顆粒物質が放出される。このような顆粒形成活性化により、主に血小板の $\alpha$ 顆粒に濃縮されている増殖因子として知られるタンパク質が放出される。放出されたこれらの増殖因子は、新組織の形成を刺激する；増殖因子は、創傷に付与されるとコラーゲン付着、脈管内殖、線維芽細胞増殖、および全般的治癒の速度を高めていることが知られている。血小板由来増殖因子（P D G F）として知られるタンパク質の放出は、単球、好中球および線維芽細胞を創傷内部へ遊走させ、治癒プロセスの炎症段階を開始させる。この期間に単球がP D G Fおよびトランスマーミング増殖因子 $\beta$ 1として知られる他の血小板タンパク質を分泌させる。これはフィブリノーゲンへの前駆物質である線維芽細胞を漸増および活性化し、治癒プロセスの修復段階を開始する。その後、創傷内のコラーゲンリモデリングのプロセスにより創傷治癒が続行する。

#### 【0011】

増殖因子が存在すると創傷の治癒が助成される。本明細書に記載する発明は、創傷における増殖因子の量を増加させ、これにより治癒速度の助成を促進する。これは、“創傷”患者、特に循環が治癒カスケードの促進に十分でない慢性創傷患者に重要である。本明細書に記載する発明は、大部分の細菌が引き起こす感染症を阻止するかまたは軽減を助ける物質で創傷領域が覆われるのも促進する；創傷治療材料が自己血液またはこれに類する生物学的材料から調製されるので、本明細書に記載する発明は1以上の第三者から得た生物学的材料より調製した治療材料の使用に伴うリスクを少なくする。自己由来製剤は、第三者から得た生物学的材料の使用に伴う共通の問題の幾つか、たとえばドナーが患者と生物学的または免疫学的に適合することおよび肝炎、H I Vなどを伴わないことを確認するためのスクリーニングが避けられる。

## 【0012】

以上の一般的科学原理に基づいて、主に血小板以外の組織から得られる生物学的材料より調製した創傷シーラントが、この分野で既知である。たとえば創傷シーラントには“フィブリングルー（fibrin glue）”が含まれる。これは本質的に補助凝集剤（トロンビンおよびカルシウム）、濃縮したフィブリノーゲンその他の凝集タンパク質の混合物である場合が多い。大部分の用途において、フィブリングルーの主な役割は、手術後に創傷の表面を封鎖して血液その他の体液が失われるのを阻止し、隣接組織の表面間を接着することである。これらの製剤は封鎖される領域上にギブス包帯のような固い覆いを形成し、四肢を動かせない傾向がある。

## 【0013】

フィブリングルーの調製には、寒冷沈降反応として知られる方法、すなわち凍結融解サイクルと制御された環境での比較的長い血漿遠心と共に含む方法で血液からフィブリノーゲンを採取し、使用に必要な十分に大量のフィブリノーゲンを濃縮することがしばしば要求される；こうして得た沈殿を-20～-30℃で凍結した後、保存する。これらが要求されるため、手術中、特に1時間以上のリードタイムがない緊急手術中に使用するには、これらの材料は適さない；さらに、この方法は自己由来の材料を用いる必要があるので、手術の直前または途中でこの方法を採用すると、患者の身体がこれらの体液を著しく必要とする時期に重要な体液を失う結果になる。これに対し、凍結の必要がない分画血液遠心による最近の方法では、体液を著しく失うことなく数分以内に実質的により大量の濃縮血小板をより簡便に得ることができる。

## 【0014】

これまで、フィブリングルーに関する研究が多くある。これは本発明とは別分野であると考えられる。その理由は主に、フィブリングルーは一般に血小板を含まない寒冷沈降タンパク質を含有するからである。フィブリングルーの使用については科学文献中で広く考察されている；たとえば米国特許第5,585,007号（1996年12月17日、アンタナビッチらに交付）に引用された参考文献を参照されたい。

## 【0015】

ある分画遠心法では、患者自身の血液を本質的に少なくとも3つの異なる成分、すなわち圧縮赤血球、血漿および血小板濃縮物に分離できる。血小板濃縮物を、トロンピンと混合したナトリウムまたはカルシウムの溶液（“カルシウム添加（calcified）トロンピン”）に混和すると、しばしばゼラチン状の活性化血小板が生成し、これは必要な粘度をもつものとして形成されれば創傷シーラントとして使用できる。このようなシーラントは一般に硬化して適用部位を覆う固い素材になり、これによりその部位を封鎖する。最初は粘稠なゼラチン状態が通常は硬化して、下記の機能を果たす：（1）それがパッチとして効果的に作用するので、血液その他の体液の喪失が止む；（2）創傷を外部の汚染物質に対し封鎖する；（3）単なる創傷縫合に伴う従来の問題を阻止する。

## 【0016】

血小板を含有する創傷治癒用組成物は、血小板を含有しない物質より優れた利点をもつ。その理由のひとつは、天然の創傷治癒物質が血小板により放出されるからである。さらに、血小板の濃縮によって創傷治癒因子の量も濃縮される。さらに、本発明の創傷治癒用組成物は患者の生物学的物質から調製されるので、異種ドナーに伴うリスク（たとえば疾病、免疫反応など）が除かれる。

## 【0017】

自己由来血小板ゲルの分野に関連する研究は、これまで手術中の血液処理（止血作用）、すなわち手術の途中または直後の血液喪失を阻止することに注目していた。普通は、患者が手術台上にいるとき、行う手術の種類によっては大量の血液その他の体液が失われる。この血液喪失に対処するために、従来の方法は患者に血液を注入することであり、これは通常は1以上の第三者から提供される（または時には外科処置をする患者自身からあらかじめ提供される）。このような場合に用いる採血法には多様な種類がある。

## 【0018】

異種供血を含む方法に伴う疾病、免疫反応または他の合併症のリスクは明らかに高いので、患者の手術中に同時に得られる血液を利用する試みが最近行われている。この血液を分画および／または濾過し、次いで患者に再注入すると、多く

の時間、経費、体液を節約でき、かつ前記に述べた普通のリスクを避けることができる。

#### 【0019】

自己由来血小板ゲルの利用に注目したのは、手術中の血液処理の場からである。手術により生じる開放創傷に血小板ゲルを用いることは、最近著しく成功している。この利用により患者自身の血液を確保でき、かつ経費を少なくすることができる。

#### 【0020】

議論の余地はあるが、以下の特許は本明細書に開示する発明に関連する：

<u>特許番号</u>	<u>発明者</u>	<u>日付</u>
5, 733, 545	フード	1998年3月31日
5, 585, 007	アンタナビッチら	1996年12月17日
5, 165, 938	ナイトン	1992年11月24日
5, 674, 912	マーチン	1997年10月7日

しかし、それらに開示される発明は、特許的にみて本明細書に開示する発明と区別される。

#### 【0021】

フードの特許は、血漿、血小板（少なくとも $10^9$ 細胞/ $m l$ の濃度）、フィブリノーゲン（少なくとも $5 mg/m l$ の濃度）、白血球（少なくとも $3 \times 10^7$ 細胞/ $m l$ の濃度）を含む血漿一パフィーコート濃縮物を特許請求している。

フードの特許は血漿から水を除去することにより血液濃縮を行っている。フードの特許は、ビタミン、抗生物質その他の物質の濃度を高める利点も認識していない。たとえば、ビタミンCの量が高いほど、実質的に血小板に由来する線維性物質のゼラチン状組成物の粘度および寿命が延長されると考えている。他の例として、フードの発明はレチノイド、たとえばビタミンA（レチノール）および/またはビタミンEを含有させる利点を認識していない。たとえばステロイド剤を含む処置を受けている患者は、免疫系が抑制されているか、または他の形で刺激に対し非応答性であることが多い；ビタミンA量を高めると、この非応答性に対抗し、これにより創傷治癒の助成が促進されることが知られている。同様に、ビタ

ミンE濃度を高めると、創傷治癒の助成が促進されると考えられる。

#### 【0022】

ナイトンの特許には、調製した増殖因子滲出液からすべての血小板膜およびフィブリノーゲンを隔離（および除去）した後、単離した複数の増殖因子を生物学的に適合するキャリヤー物質と組み合わせて使用することが開示されている。それらの膜を廃棄することにより、膜中に濃縮していることが分かっている残りの増殖因子、およびマトリックス形成を促進するための潜在受容体部位が組成物から本質的に除去される。ナイトン特許に用いた方法は、使用前の-20~-30°Cでの保存を含めて、時間を消費する労力集約型の工程も多数必要とする。ナイトン法には、創傷治療を毎日繰り返すことも必要である。

#### 【0023】

アンタナビッチ特許には、主に血漿をベースとする組成物が開示され、ナイトン法と同様に、血小板、フィブリノーゲンおよびフィブリネクチンを含む血漿濃縮物の投与のために、生物学的に許容できるキャリヤーが必要である。アンタナビッチ組成物は本質的に、創傷の封鎖に十分な高い引張り強さ（粘度）をもつことを意図したフィブリングルーである。

#### 【0024】

マーチン特許が関連性をもつという点では、マーチンは日焼け止め、抗炎症剤および創傷治癒用組成物を含む組成物を開示している（マーチン、6欄6行~7欄2行）。その創傷治癒組成物は、ピルビン酸、酸化防止剤（ビタミンA、CおよびEを含む）、および細胞膜修復に必要な脂肪酸の組合せを含む（マーチン、7欄2~8行）。日光からの遮蔽よりむしろ日光中での使用を意図したマーチン組成物に対するビタミン類の有用性および機能は、後記に説明するように本明細書に開示する発明に対するビタミン類の有用性および機能とは異なる。

#### 【0025】

濃縮血小板にトロンビンを添加した場合に普通起きる化学反応およびカスケードは、実際に複雑である。それらについてはReed等による科学報文、Proceedings of the American Academy of Cardiovascular Perfusion, Vol. 14, 19

93年1月14日、に述べられている。これら種々の反応を損なわず、実質的に妨害せず、または消失させない保持剤（preservative）または創傷治癒助成物質を添加することが、本明細書に開示する発明の重要な点である。

#### 【0026】

本発明の目的のひとつは、患者のいる所で迅速かつ簡便に調製できる創傷治療材料を提供することである。

#### 【0027】

本発明の他の目的は、創傷の治癒を促進する創傷治療材料を提供することである。

#### 【0028】

本発明の他の目的は、創傷感染症の防止を促進する創傷治療材料を提供することである。

#### 【0029】

本発明の他の目的は、本明細書中に記載され、示唆され、または本来ある目的を満たす創傷治療材料の調製方法を提供することである。

#### 【0030】

本発明の他の目的は、本明細書中に記載され、示唆され、または本来ある目的を満たす創傷治療材料の使用方法を提供することである。

#### 【0031】

##### 発明の概要

最も一般的には、本明細書に記載する発明は、組成物調製の速度および簡便性を改良することにより濃縮血小板材料、特にゲル状のものの用途を拡大する；本明細書に記載する発明は、より長期間にわたる用途にさらに利用できるようすることにより、また創傷治癒性および感染攻撃性を高めることにより、濃縮血小板組成物の性能も改良する。自己由来血小板ゲルがより有用であるためには、ゼラチン状態を妥当な期間安定に維持しなければならない。本発明の1態様は、血小板ゲルに保持剤、たとえばアスコルビン酸を添加することである。

#### 【0032】

本発明の他の態様は、得られる濃縮血小板組成物が1種類または多種類の抗生

物質を含有するように、加工期間中の1以上の時点で1種類以上の抗生物質を添加することを伴う。複雑な治癒カスケードを高める抗生物質を濃縮血小板組成物に使用するのは、実際に新規である。本明細書に記載する発明は、これら種々の反応、pHバランスおよび力値を損なわず、実質的に妨害せず、または消失させない様式で、それらの物質を添加することを伴う。

#### 【0033】

本発明の他の態様は、創傷治癒を助成することが知られている1種類以上のビタミン、たとえばビタミンおよびビタミンEを添加することを伴う。

#### 【0034】

本明細書に記載するゲル状組成物の調製方法は、カルシウム添加トロンビン（または好ましくはカルシウム添加した他のアゴニスト）の添加前に、少なくとも1種類の前記添加剤と低血漿（plasma-poor）濃縮血小板を、ゲル化のためそれ以上の分散が阻害される前に添加剤が組成物中に目的とする程度に分散するのに十分な期間、混合することを含む。

#### 【0035】

##### 発明の詳細な説明

本発明を詳述する前に、本発明が本明細書に具体的に開示される特定の構造、プロセス工程および材料に限定されないことを理解すべきである；本発明は、本明細書に述べる開示内容に潜在的にまたは本来含まれるもの、およびあらゆる要素または限定の合法的均等物を包含する。一例として、本明細書に記載する生物学的材料は、治療される患者、1つの第三者または複数の第三者に由来するものであってもよい；さらに、第三者は患者と同種であってもよく、またはその生物学的材料に由来する創傷治療材料が患者と生物学的に適合性である限り、他の種であってもよい。他の例として、本発明が具体的な物質を必要とする場合、その必要性を満たす特性をもつ任意の形のその物質を用いればよい；たとえば別途指示しない限り、増殖因子の必要性は単離した増殖因子、もしくは血小板その他のタイプの細胞に含有される増殖因子、および／またはその組合せを供給することにより満たすことができる。同様に、増殖因子を得るために用いる方法は、それが遠心を含むか否かに関係なく、それを十分に達成するいかなる方法であって

もよい。

**【0036】**

本発明の範囲は特許請求の範囲およびその均等物によってのみ限定されるので、本明細書中で用いる名称は限定するためのものではないことも理解すべきである。また、別途指示しない限り、本明細書中で用いる単数形は複数形を含み、逆も同じである。

**【0037】**

簡潔にするために、また本出願の特許請求の範囲を広く解釈および構築できるように、下記の定義を適用する：

- (a) “採血”または“血液の採取”という句（またはこれに類する句）には、当技術分野で既知の方法、材料および装置、たとえば抗凝固薬の含有、採血装置および注入装置の使用が含まれる；
- (b) “増殖因子”という句は、組織の増殖を助成するいかなる物質も意味する；
- (c) “トロンビン”という語には、カルシウム添加トロンビン、特に塩化カルシウム水溶液 1 ml 当たり約 5,000 単位のトロンビンが含まれる；それはカルシウム添加したウシトロンビンおよび自己トロンビンも含むことができる；
- (d) “粘度”という語は、その材料のゲル化度を判定する特性、たとえばその材料の固さまたは硬度、すなわちその材料が流体のように流れるのに抵抗する度合いを意味する；
- (e) “療法に有効な量”という語は、創傷の治癒（たとえば創傷の体積または表面積の低下；コラーゲン付着、血管内殖、線維芽細胞増殖または全般的治癒を促進する顆粒組織その他の生体物質の量の増加）を高めるのに必要な、構成要素またはその組合せの量を意味する；本明細書に記載する発明のすべての態様が、療法に有効な量の成分物質またはその組合せを含むものとする。

**【0038】**

簡潔にするために、また本出願の特許請求の範囲を広く解釈および構築できるために必要ならば、“および”という接続詞は“または”という接続詞を含むものと解釈でき、逆も同じである。また、複数形を用いる場合、それは単数形を含

むと解釈でき、逆も同じである。

【0039】

最も一般的には、本発明は活性化増殖因子およびアスコルビン酸を含む創傷治癒剤組成物を包含する。本発明の一般的な態様において、増殖因子は血小板内に含有される。身体は一般に増殖因子として知られる多数の物質を产生し、本発明の増殖因子は血小板由来増殖因子（PDGF）、血小板由来脈管形成因子（PDAF）、血管内皮増殖因子（VEGF）、血小板由来上皮増殖因子（PDEGF）  
、血小板第4因子（PF-4）、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ （TGF-B）  
、酸性線維芽細胞増殖因子（FGF-A）、塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-B）、トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$ （TGF-A）、インスリン様第1'および第2増殖因子（IGF-1およびIGF-2）、 $\beta$ -トロンボグロブリン関連タンパク質（BTG）、トロンボスpongin（TSP）、フィプロネクチン、  
、フォンバレンプラント因子（von Wallenbrand's fact or, vWF）、フィプロペプチドA、フィブリノーゲン、アルブミン、プラスミノーゲンアクチベーター第1阻害物質（PAI-1）、オステオネクチン、RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted)、gro- $\alpha$ 、ビトロネクチン、フィブリンD二量体、V因子、アンチトロンビンIII、免疫グロブリンG（IgG）、免疫グロブリンM（IgM）、免疫グロブリンA（IgA）、a2マクログロブリン、アンギオゲニン、Fg-D、エラスター $\gamma$ 、角質細胞増殖因子（KGF）、上皮増殖因子（EGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、腫瘍壞死因子（TNF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）およびインターロイキン-1（IL-1）、ならびにその組合せよりなる群から選択される。各物質に共通の重要な特性（それぞれをこの特定の群に含める根柢となる）のひとつは、その物質それが細胞または組織の増殖を高めることができることが知られているか、またはそう考えられることである。さらに、それらの物質またはその多様な組合せが予想外の相乗的様式で相互に機能して創傷の治癒を助成することが知られているか、またはそう考えられる

。

## 【0040】

血小板は、主に分画遠心により全血の赤血球および白血球から分離される。しかし、血小板が他の血液成分から完全に単離されるのは稀であるという事実により、本明細書に開示する組成物全体に、ある付随量の白血球が含有されてもよい。本発明は白血球を少量または微量しか含有しないと考えられる；本発明の白血球数は、一般に約 $3 \times 10^7$ 細胞/ml未満であると考えられる。本発明は、細胞を濃縮するのに水を除去するのではない。本発明の生物材料はほとんど例外なく血小板由来である。隔離される血小板の平均血小板体積の範囲は、約6.6～8.4フェムトリットル(f1)、平均約7.7f1である；これは、隔離される血小板が血小板集団全体より比較的大きいか、または若いことを示す。

## 【0041】

増殖因子の活性化は、多様な様式で、活性化剤またはアゴニストとして記載の多様な物質により行うことができる。本明細書に記載する発明において、活性化はトロンビン、コラーゲン、セロトニン、アデノシン二リン酸(ADP)およびアセチルコリン(ACh)、ならびにその組合せよりなる群から選択される活性化剤またはアゴニストの含有により起きる。本発明の特定の態様において、増殖因子は濃縮血小板に含有され、活性化はトロンビンの含有により起きる。各物質に共通の重要な特性（それをこの特定の群に含める根拠となる）は、その物質それが細胞または組織の増殖を高めることができるとされているか、またはそう考えられることである。さらに、それらの物質またはその多様な組合せが予想外の相乗的様式で相互に機能して創傷の治癒を助成することが知られているか、またはそう考えられる。

## 【0042】

本発明は、濃縮血小板が創傷患者自身の生物学的材料から得られる場合のような自己由来の生物学的材料に限定されない。本発明は、1以上の第三者から得られる生物学的材料の使用を包含する。第三者は、その第三者の生物学的材料の使用により生物学的不適合が起きない限り、本明細書に記載する創傷治癒剤組成物でその創傷が治療される患者と同一種である必要はない。

## 【0043】

本発明の一般的な態様のひとつにおいて、創傷治癒剤組成物は濃縮血小板、トロンビンおよびアスコルビン酸を含む。アスコルビン酸は、日光その他の紫外線(UV)源に暴露された後のような分解が起きない限り、保持性をもつことが知られている。しかし本明細書に記載する発明の大部分の態様が、創傷部位に付与されたほとんど直後に包帯で覆われるか、または他の形でUVから遮断される。

#### 【0044】

トロンビンまたは他のアゴニストの混合により増殖因子は活性化されるので、トロンビン（または他のアゴニスト／活性化剤）は通常はゼラチン状態にしたい直前に混合すべき最後の物質である。

#### 【0045】

本発明の他の態様には、混合物中にアスコルビン酸のほかに、またはその代わりに、少なくとも1種類のレチノイドを含有させるものが含まれる。創傷治癒剤組成物にはレチノイドの組合せを含有させてもよいが、本発明の1態様はアスコルビン酸のほかに、またはその代わりに、ビタミンAを含有するだけである。ビタミンAは、ステロイドを用いたある種の治療の副作用に対抗すること、すなわち抑制された身体免疫系の反応性を刺激することが知られている。さらに、ビタミンAは細胞内および間質環境のマンガン、マグネシウムおよび銅の生物学的活性を阻害または低下させることができると考えられる；それらの元素は、ケロイドや瘢痕組織の付着活性をもつか、またはそのきっかけとなることが知られており、またはそう考えられる（ヒトの皮膚の創傷の治癒プロセスに対するパントテン酸およびアスコルビン酸補充の影響、Vaxmanら、Eur. Surg. Res. 1995, 28:4, 158-166参照）。したがって、ビタミンAを含有する本明細書記載の態様は、さほどの瘢痕形成やケロイド形成なしに治癒を助成すると考えられる。他の態様においてレチノイドは、治癒を促進することが知られているビタミンEである。いずれの場合も、本明細書に示すビタミン（またはその組合せ）は予想外に相乘的に創傷の治癒を高めると思われる。

#### 【0046】

これらのビタミンの有用性および機能は酸化防止性とは無関係である。本発明

においてビタミンは局所適用して紫外線照射した場合、マーチンの場合のような酸化防止性を示さないらしいということを認識すべきである。紫外線はそれらのビタミンを急速に分解し、または他の形でそれらを実質的に無効にする；さらに、ビタミンを単なる局所適用ではなく内側に入れた場合は、酸化防止性を示す。

#### 【0047】

さらに、本明細書に開示する発明に対するそれらのビタミンの有用性および機能には、マーチン組成物に対するビタミンの有用性および機能と明らかに区別される他の相異がある。たとえば、アスコルビン酸は周囲の媒質のpHを低下させ、したがって創傷床で腐生細菌が増殖しにくくなる。

#### 【0048】

本発明の創傷治癒剤組成物には抗生物質の組合せが含有されてもよいが、本発明の1態様はアスコルビン酸のほかに、またはその代わりに、少なくとも1種類の抗生物質を含有する。創傷部位の多くは既に細菌が感染しているか、またはそれらの感染を受けやすいので、創傷治癒剤組成物は細菌を殺すか、または細菌の運動性や増殖を阻止できることが望ましい。本明細書に記載する発明には、濃縮血小板、トロンビンおよび少なくとも1種類の抗生物質を含む創傷治癒剤組成物が含まれる。特に、本発明には、抗生物質が少なくともシードモナス(*Pseudomonas*)およびクレブシエラ(*Klebsiella*)属細菌に対し殺菌性である創傷治癒剤が含まれる。これらは創傷部位に存在することが多く、防御が困難である。あるいは、抗生物質はネオスポリン、バンコマイシンおよびゲンタマイシン、ならびにその組合せよりなる群から選択される。各物質に共通の重要な特性（それぞれをこの特定の群に含める根拠となる）のひとつは、その物質それがそれらの細菌を殺すことが知られていることである。

#### 【0049】

前記のように本発明には、濃縮血小板、トロンビン、アスコルビン酸、少なくとも1種類のレチノイド、ならびにシードモナスおよびクレブシエラ属細菌に対し殺菌性である少なくとも1種類の抗生物質を含む創傷治癒剤組成物が含まれる。

#### 【0050】

創傷部位に付与されるこれらの創傷治癒剤組成物のほか、本発明はさらに創傷治癒剤組成物の調製方法を含む。本発明の低血漿-濃縮血小板を調製する1方法は、下記のものである。約450mlの全血を抗凝固剤（たとえばクエン酸ナトリウム、またはこれに類する当技術分野で既知の任意の抗凝固剤）中に採取する。次いでこの血液を少なくとも約2,000～約3,000rpmの範囲のいずれかの速度（好ましくは約2,400rpm）で約15～約25分間（好ましくは約20分間）遠心すると、（a）血漿と大部分の白血球；（b）血小板（および付随する白血球）；および赤血球のバンドが分離する。次いで血小板部分を再遠心して、血漿（および付随する白血球）をさらに分離することができる；この遠心は、少なくとも約4,000～約5,600rpmの範囲のいずれかの速度（好ましくは約4,800rpm）で約5～約10分間（好ましくは約7.1／2分）行うことができる。

#### 【0051】

最終収量は、低血漿-濃縮血小板（微量または付随量の残留血漿および白血球）約40～50mlである。血漿／白血球部分および赤血球部分と共に、患者に再注入することができる。次いでこの低血漿-濃縮血小板を、トロンビンおよび（好ましくは）カルシウムの混合物で活性化することができる。好ましくは、塩化カルシウム水溶液1.0ml中5,000単位のトロンビンを含む溶液が用いられる；血液凝固剤は一般に血中カルシウムを結合して血液凝固カスケードが起きるのを阻止するので、低血漿-濃縮血小板にさらにカルシウムを再供給して、創傷部位での血液凝固カスケードを促進する。成分の相対濃度に応じて、得られる混合物は液体であるか、または硬化して硬質材料、もしくは（好ましくは）トロンビンと血小板の相対量に応じた粘度をもつゲルとなってもよい；血小板に対するカルシウム添加トロンビンの濃度が、組成物の硬化速度および最終的な固さの程度を決定する。ある混合物は数秒以内に硬化してゲルになるのに対し、ある組成物は硬化してゲルになるのに数分かかるであろう。

#### 【0052】

硬化時間に関係なく、本発明はゲルにその粘度を長期間維持させる保持剤を含有する。たとえばアスコルビン酸はゲル粘度の寿命を保持すると考えられる。創

創治療剤組成物を調製するための他の方法には、活性化した増殖因子をアスコルビン酸と混合する工程が含まれる。それらの活性化した増殖因子は、濃縮血小板を血液から隔離し、この血小板にトロンビンを混合するなど、多様な方法で得ることができる。アスコルビン酸は、最終的な創治療剤組成物のゼラチン状態の保持性を高めるのに十分な量とすべきである。トロンビンは、組成物および創傷中に十分に活性化する増殖因子が存在する状態で目的レベルの粘度をもつ凝塊（ゲル）の形成を促進するのに十分な量とすべきである。

#### 【0053】

組成物の好ましい1態様においては、アスコルビン酸約1mIを濃縮血小板8mIと混合し、次いで約1mIのカルシウム添加トロンビンをこの9mIの混合物に混入する。しかし、治療剤の目的量、ゲル化時間、ゲルの粘度および寿命に応じて、他の比率の濃縮血小板：アスコルビン酸：トロンビンも使用できる。

#### 【0054】

組成物を調製するための他の方法では、血液を採取し、低血漿—濃縮血小板を隔離し、添加剤を混合し、そして使用しない血液成分を患者に戻すことができる。このすべてを約20～30分以内に、患者に1回穿刺するだけで行うことができる。約125～250mIの血液を患者から採取し、採血装置を所望により患者に接続したままにする（使用しない血液成分をのちに患者に戻すのに用いるために）。その血液をラサムボウル（Lathum bowl）に移し、血漿バンド（またはこれに類するグループ）が上端に生成し（約5～15分）、赤血球バンド（またはこれに類するグループ）がボウルの底に生成するまで、約4, 800rpmで約10分間、遠心機（たとえばヘモネティクス社製のもの）で遠心する；中間は低血漿—濃縮血小板からなる。血漿バンドを患者に戻すために取り出し、残りの血液成分をその速度で（十分な期間）再遠心して、低血漿—濃縮血小板から血漿および白血球をさらに分離する。次いで低血漿—濃縮血小板を、本明細書に記載する他の添加剤（トロンビン、アスコルビン酸および／またはレチノイド）との混合のために取り出す。

#### 【0055】

組成物を調製するための他の方法は、トロンビンを混合する前に、または混合

と同時に、創傷の治癒をさらに高めるのに十分な量の前記レチノイドを少なくとも1種類混合することをさらに含む。1態様においては、1mlのトロンビンを混入する前に、ビタミンAおよびビタミンEの均質な溶液1mlを8mlの濃縮血小板および1mlのアスコルビン酸に添加する。

#### 【0056】

あるいはその方法には、トロンビンを混合する前に、または混合と同時に、細菌感染を低下させるのに十分な量の前記抗生物質を少なくとも1種類混合することが含まれてもよい。

#### 【0057】

本明細書に記載する発明は、創傷治癒剤組成物の調製方法のほかに、増殖因子およびアスコルビン酸を含む組成物を創傷治癒の促進に十分な量で適用する工程を含む、創傷治療方法も包含する。その創傷治療方法には、本明細書に記載するいかなる組成物の使用も含まれる；この方法には、本明細書に記載するいかなる方法で調製したいかなる組成物の使用も含まれる。

#### 【0058】

いったん創傷に付与すると、この組成物は5日間も、また創傷の位置や創傷の他の特性などの状況によってはおそらくそれ以上、創傷上に留めることができる。本明細書に記載した組成物および方法は慢性創傷の治療に特に有用であるが、急性創傷の治療にも有用である。

#### 【0059】

##### 実施例1

治療試験：患者Pは、57歳、白人男性、トラック運転手であり、右踵に11カ月持続している糖尿病製潰瘍を伴う。その治療法は、休息、負荷をかけないこと（off-loading）、および石鹼と水による1日1回の創傷洗浄後、ガーゼ包帯をまくことからなっていた。カラシン（Carrasyn）ゲルを短期間処方されたが、改善はみられなかった。創傷治療のために外来物理療法科に紹介された時点でのPの療法は、週1回の強い創面切除（デブリドマン）、湿った食塩水ガーゼ、および全接触ギブス包帯（total contact cast）である。Pには高血圧の病歴があるが、現在はコントロールされている。

彼には15年間の神経障害を伴う糖尿病歴があり、これは経口血糖降下剤でコントロールされている。

#### 【0060】

Pを本明細書に開示する発明により治療し始めた。彼の創傷を強く創面切除した後、ゲル凝固物を適用し、創傷を湿った食塩水包帯で覆った。次いで全接触ギブス包帯をし、1週間そのままにした。第1週の終了時にギブス包帯をはずし、創傷部位を洗浄し、湿った包帯で再び覆った；第2週の間、足を再びギブス包帯した。第2週の終了時に同じ治療を行った；ただし、湿った包帯で覆う前に創傷部位にゲル凝固物を再び適用した。第3週の終了時後、第2週と同じ治療を行った。この治療法を合計36日間続けた。下記の表1に、第1～4週の創傷部位体積および表面積の減少を反映するデータを示す。

#### 【0061】

【表1】

表 1

週 #	体積 (mm <sup>3</sup> )	面積 (mm <sup>2</sup> )
0	3121	674
1	1561	562
2	279	301
3	26	282
4	15	159

#### 【0062】

実施例2

#### 【0063】

【表2】

患者#	体積 (mm <sup>3</sup> )		面積 (mm <sup>2</sup> )	
	Start	End	Start	End
1	3121 mm <sup>3</sup>	15 mm <sup>3</sup>	674 mm <sup>2</sup>	159 mm <sup>2</sup>
2	358 mm <sup>3</sup>	0.0 mm <sup>3</sup>	65 mm <sup>2</sup>	4 mm <sup>2</sup>
3	293 mm <sup>3</sup>	3.0 mm <sup>3</sup>	63 mm <sup>2</sup>	3 mm <sup>2</sup>
4	192 mm <sup>3</sup>	18 mm <sup>3</sup>	104 mm <sup>2</sup>	39 mm <sup>2</sup>
5	336 mm <sup>3</sup>	0.0 mm <sup>3</sup>	181 mm <sup>2</sup>	0.0 mm <sup>2</sup>

## 【0064】

この試験に参加したこれら5人の患者は、彼らの医師により紹介された。そこで、これらの患者を取捨選択基準でスクリーニングした。試験のために選ばれた患者は、下肢末端に潰瘍をもち、これは伝統的な創傷治療のみ、または伝統的な治療とレグラネックス [Regranex、オルトーマックニール (Ortho-McNeil) の単一増殖因子製剤、ジョンソン・アンド・ジョンソンが販売] で4~6ヶ月の治療後も治癒していなかった。

## 【0065】

被験患者5人全員が、血小板数100,000個/mm<sup>3</sup>以上、ヘモグロビン >10g、およびHCT 30%以上であった。患者を創傷における感染、および骨髄炎について評価した。感染や骨への波及を示した被験患者はいなかった。

## 【0066】

慢性創傷が本質的に急性創傷に変化するほど強い創面切除を採用した。潰瘍と周囲のカルスを、波及していない正常組織に達するまで完全に切除した。すべての被験者を外来患者として治療した。すべての患者が重い物を全く持たないことに同意した。1人を除いて、足の罹患していない領域に体重を移す半靴を支給した。半靴をはかない1人の患者には、下肢の全ギブス包帯をつけた。患者と家族の直接アンケートにより、コンプライアンス問題を評価した。1人の患者だけがコンプライアンスなしであることが分かった。患者4の血糖は400mg/dlを超えた。彼女は見当識障害になり、処置後2日目に立ち歩いた。その結果、患者4は再治療となった(患者#4 NCはこの試験期間中コンプライアンスなしで)

あり、3回来院しなかった）。表2に、本明細書に記載した血液凝固物による治療の開始時と終了時の創傷の大きさと体積を示す。閉合に要したのは平均4週間未満であった。平均して患者の創傷は25日以内に99%閉合した。

**【手続補正書】**

【提出日】平成12年3月10日(2000.3.10)

**【手続補正1】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】療法に有効な量の活性化増殖因子およびアスコルビン酸を含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項2】増殖因子が血小板に由来する、請求項1記載の創傷治癒剤。

【請求項3】増殖因子が血小板由来増殖因子(PDG F)、血小板由来脈管形成因子(PDA F)、血管内皮増殖因子(VEG F)、血小板由来上皮増殖因子(PDE G F)、血小板第4因子(PF-4)、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ (TGF-B)、酸性線維芽細胞増殖因子(FGF-A)、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-B)、トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$ (TGF-A)、インスリン様第1および第2増殖因子(IGF-1およびIGF-2)、 $\beta$ -トロンボグロブリン関連タンパク質(BTG)、トロンボスponジン(TSP)、フィプロネクチン、フォンバレンプラント因子(vWF)、フィプロペプチドA、フィブリノーゲン、アルブミン、プラスミノーゲンアクチベーター第1阻害物質(PAI-1)、オステオネクチン、RANTES、gro- $\alpha$ 、ビトロネクチン、フィブリンド二量体、V因子、アンチトロンビンIII、免疫グロブリン-G(IgG)、免疫グロブリン-M(IgM)、免疫グロブリン-A(IgA)、a2マクログロブリン、アンギオゲニン、FG-D、エラスター $\gamma$ 、角質細胞増殖因子(KGF)、上皮増殖因子(EGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、腫瘍壞死因子(TNF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)およびインターロイキン-1(IL-1)、ならびにその組合せよりなる群から選択される、請求項1記載の創傷治癒剤。

【請求項4】活性化が、トロンビン、コラーゲン、セロトニン、アデノシン

ニリン酸(ADP)およびアセチルコリン(ACH)、ならびにその組合せよりなる群から選択されるアゴニストの含有により起きる、請求項1記載の創傷治癒剤。

【請求項5】 増殖因子が濃縮血小板に含有され、活性化がトロンビンにより起きる、請求項1記載の創傷治癒剤。

【請求項6】 濃縮血小板が創傷患者自身の生物学的材料から得られ、白血球数が約 $3 \times 10^7$ 細胞/ml未満である、請求項5記載の創傷治癒剤。

【請求項7】 療法に有効な量の、濃縮血小板、アスコルビン酸およびトロンビンを含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項8】 療法に有効な量の、濃縮血小板、少なくとも1種類のレチノイド、およびトロンビンを含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項9】 レチノイドがビタミンAである、請求項8記載の創傷治癒剤組成物。

【請求項10】 レチノイドがビタミンEである、請求項8記載の創傷治癒剤組成物。

【請求項11】 療法に有効な量の、濃縮血小板、少なくとも1種類の抗生物質、およびトロンビンを含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項12】 抗生物質が少なくともシュードモナス(Pseudomonas)およびクレブシエラ(Klebsiella)細菌に対し殺菌性である、請求項11記載の創傷治癒剤。

【請求項13】 抗生物質がネオスポリン、パンコマイシンおよびゲンタマイシン、ならびにその組合せよりなる群から選択される、請求項11記載の創傷治癒剤。

【請求項14】 濃縮血小板、アスコルビン酸、少なくとも1種類のレチノイド、少なくともシュードモナスおよびクレブシエラに対し殺菌性である少なくとも1種類の抗生物質、ならびにトロンビンを含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項15】 約8mlの濃縮血小板、約1mlのアスコルビン酸および約1mlのトロンビンを含む、創傷治癒剤組成物。

【請求項16】 さらに、約1mlのビタミンAおよびビタミンEを含む、請

求項15記載の創傷治癒剤組成物。

【請求項17】 療法に有効な量で、活性化増殖因子をアスコルビン酸と混合する工程を含む、創傷治癒剤組成物の製造方法。

【請求項18】 活性化増殖因子が、濃縮血小板を隔離し、これらの血小板をトロンビンと混合する工程により得られる、請求項17記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項19】 隔離が、血液を少なくとも約2,000～約3,000 rpmの範囲のいずれかの速度で約15～約25分間遠心することにより血小板を他の血液成分から分離し、次いで少なくとも約4,000～約5,600 rpmの範囲のいずれかの速度で約5～約10分間遠心することによりこれらの血小板をさらに濃縮し、そして濃縮血小板とアスコルビン酸、次いでトロンビンを、目的レベルの粘度および持続性をもつゲルを形成しかつ療法に有効な量の治癒剤を得るのに十分な量で混合する工程を含む、請求項18記載の創傷治癒剤の製造方法

。

【請求項20】 血小板をまず分離するための遠心速度が約2,400 rpm、遠心時間が約20分であり；

血小板をさらに濃縮するための遠心速度が約4,800 rpm、遠心時間が約7 1/2分であり；そして

約1mlのアスコルビン酸を約8mlの濃縮血小板に混入する、

請求項19記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項21】 トロンビン量が、塩化カルシウム水溶液約1.0ml中約5,000単位である、請求項20記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項22】 トロンビンを混合する前に、創傷治癒をさらに高めるのに足る量の少なくとも1種類のレチノイドを混合することをさらに含む、請求項17記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項23】 レチノイドが、刺激に対する創傷患者の免疫系の非応答性を低下させるのに足る量のビタミンA、および創傷治癒をさらに高めるのに足る量のビタミンEである、請求項22記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項24】 約1mlのビタミンAおよびビタミンEを、約8mlの濃縮

血小板および約1m1のアスコルビン酸と混合し、次いで塩化カルシウム水溶液約1.0m1中約5,000単位のトロンビンと混合する、請求項23記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項25】 トロンビンを混合する前に、細菌感染を低下させるのに足る量の少なくとも1種類の抗生物質を混合することをさらに含む、請求項17記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項26】 抗生物質が少なくともシードモナスおよびクレブシエラ細菌に対し殺菌性である、請求項25記載の創傷治癒剤の製造方法。

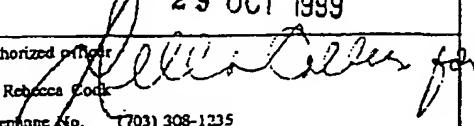
【請求項27】 抗生物質がネオスポリン、バンコマイシンおよびゲンタマイシン、ならびにその組合せよりなる群から選択される、請求項25記載の創傷治癒剤の製造方法。

【請求項28】 トロンビンを混合する前に、療法に有効な量で、濃縮血小板、アスコルビン酸、少なくとも1種類のレチノイド、ならびに少なくともシードモナスおよびクレブシエラ細菌に対し殺菌性である少なくとも1種類の抗生物質を混合する工程を含む、創傷治癒剤の製造方法。

【請求項29】 患者から血液を採取し；本質的に分離した血漿バンド、本質的に分離した赤血球バンド、およびそれらの間にある濃縮血小板を含む本質的に中間のグループが現れるまで、血液を遠心し；血漿バンドを分離し；残りの血液成分をその速度でそれに十分な期間遠心し；濃縮血小板を分離し；そして療法に有効な量で、この濃縮血小板をトロンビンと混合する工程を含む、創傷治癒剤組成物の製造方法。

【請求項30】 患者から約125～250m1の血液を採取し；その血液をラサムボウルに移して、血漿バンドが上端に生成し、赤血球バンドがボウルの底に生成し、それらの間に濃縮血小板を含む本質的に中間のグループが生成するまで、約4,800rpmで約10分間、血液を遠心し；残りの血液成分の2回目の遠心をその速度でその期間行う、請求項29記載の創傷治癒剤組成物の製造方法。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/13958
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : A61K 31/22, 31/34, 31/70, 31/405, 35/14, 38/00 US CL : 514/2, 12, 34, 36, 39, 46, 415, 474, 532, 546 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/2, 12, 34, 36, 39, 46, 415, 474, 532, 546		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY, HCAPLUS, WPIDS, BIOSIS, MEDLINE, CABAB, AGRICOLA, USPATFULL		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4,427,651 A (M. STROETMANN) 24 January 1984, see abstract.	1-44
Y	US 5,165,938 A (D. KNIGHTON) 24 November 1992, see abstract, column 2, lines 39-53.	1-44
Y	US 5,585,007 A (R. ANTANAVICH) 17 December 1996, see abstract, column 1,2 lines 61-67 - column 13, lines 1-19.	1-44
Y	US 5,607,694 A (G. MARX) 04 March 1997, see abstract, column 2, lines 16-31.	1-44
Y	US 5,674,912 A (MARTIN) 07 October 1997, see abstract.	1-44
Y	US 5,733,545 A (A. HOOD) 31 March 1998, asce abstract.	1-44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'B' earlier document published on or after the international filing date 'C' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is used to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'D' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'E' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 01 SEPTEMBER 1999		Date of mailing of the international search report 29 OCT 1999
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer  Telephone No. (703) 308-1235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/13938
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Database HCAPLUS on STN, (Columbus, OH, USA), 103:59296, MANN, Wound healing compositions, see abstract.	1-44
Y	Database HCAPLUS on STN, (Columbus, OH, USA), 118:225439, SAIKA, S. 'Effect of L-ascorbic acid 2-phosphate on corneal wound healing,' abstract, Wakayama Igaku, abstract, 1992.	1-44
Y	BIOSIS on STN, (Columbus, OH, USA), 1993:356018, CLEWELL, K. 'Topically applied ascorbic acid enhances wound healing and production of connective tissue proteins,' abstract, Journal of Investigative Dermatology, 1993.	1-44
Y	Database HCAPLUS on STN, (Columbus, OH, USA), 126:135685, MACPHEE et al. (AMERICAN NATIONAL RED CROSS, USA) 'Supplemented and unsupplemented tissue sealants, methods of their production and use,' see abstract.	1-44

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)\*

## フロントページの続き

(51) Int.C1. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークコード(参考)
A 6 1 K	38/43	A 6 1 P	17/02
	38/46		43/00
	39/395	A 6 1 K	37/24
	45/00		37/02
A 6 1 P	17/02		37/465
	43/00		37/54
(31) 優先権主張番号	P C T / U S 9 9 / 0 2 9 8 1		
(32) 優先日	平成11年2月13日(1999. 2. 13)		
(33) 優先権主張国	米国( U S )		
(81) 指定国	E P ( A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E ), A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G, B R, B Y, C A , C H, C N, C U, C Z, D E, D K, E E, E S, F I, G B, G D, G E, G H, G M, H R, H U, I D, I L, I N, I S, J P, K E, K G, K P, K R , K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L U, L V, M D, M G, M K, M N, M W, M X, N O, N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G, S I, S K , S L, T J, T M, T R, T T, U A, U G, U S, U Z, V N, Y U, Z W		
F ターム(参考)	4C084 AA02 AA03 AA19 BA44 DA13 DA25 DA36 DA39 DA40 DB53 DB54 DB55 DB57 DB58 DC03 DC11 DC32 DC35 MA02 NA14 ZA892 ZC012 4C085 AA33 4C086 AA01 AA02 BA09 BA18 MA02 MA03 MA04 NA14 ZA89 ZC01 ZC75 4C087 AA01 AA02 DA21 MA02 NA14 ZA89 ZC01 ZC75		